

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①⑫ Offenlegungsschrift
①⑪ DE 3933850 A 1

②① Aktenzeichen: P 39 33 850.9
②② Anmeldetag: 6. 10. 89
②③ Offenlegungstag: 18. 4. 91

⑤① Int. Cl. 5:
C 12 N 1/20

C 12 N 5/22
C 12 P 19/34
C 12 P 21/02
C 07 K 15/28
A 61 K 35/72
A 61 K 37/64
// (C12N 1/20,
C12R 1:19)

DE 3933850 A 1

⑦① Anmelder:
Schering AG, 1000 Berlin und 4709 Bergkamen, DE

⑦② Erfinder:
Tschopp, Jürg, Prof., Epalinges, CH; Jenne, Dieter,
Dr., Lausanne, CH

⑤④ Zytolyse-Inhibitor (ZLI), eine diese Blutplasma protein kodierende DNA-Sequenz, sowie ein Plasmid, ein Wirtsorganismus und ein Verfahren zur Gewinnung dieses Proteins

Die Erfindung betrifft eine neue Blutplasmakomponente mit starker Hemmwirkung auf die durch terminale Komplementproteine wie z. B. durch das von Killerzellen sezernierte Perforin oder durch das α -Toxin von Staphylococcus aureus vermittelte Zielzell-Lyse.

DE 3933850 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine neue Blutplasmakomponente mit starker Hemmwirkung auf die durch terminale Komplementproteine wie z. B. durch das von Killerzellen sezernierte Perforin oder durch das α -Toxin von Staphylococcus aureus vermittelte Zielzell-Lyse.

Die vorliegende Erfindung wird insbesondere durch die Ansprüche 1—25 wiedergegeben.

Die immunologische Abwehr gegenüber eingedrungenen Viren, Bakterien, virustransformierten und Virusbefallenen Zellen, maligne veränderten oder durch Alterung veränderten körpereigenen Zellen, gegen Spermien im weiblichen Genitaltrakt und gegen körperfremde Substanzen der Umwelt wird durch zwei sich ergänzende Effektsysteme sichergestellt.

Das zelluläre Effektsystem besteht aus speziell ausgereiften Immunzellen, den sogenannten zytotoxischen T-Lymphozyten und den natürlichen Killerzellen. Lymphozyten und natürliche Killerzellen sind in der Lage, mit Hilfe eigener Oberflächenrezeptoren körperfremde Strukturen auf anderen körpereigenen Zellen und im interstitiellen Gewebe zu erkennen und die Ausbreitung und Vermehrung dieser körperfremden Substanzen und Mikroorganismen wirksam zu verhindern. Aktivierte zytotoxische Lymphozyten und natürliche Killerzellen nehmen engen Kontakt mit den als fremd erkannten Zielzellen auf und setzen gezielt membranschädigende Moleküle frei, gegen die sie selbst geschützt sind. Das eigentliche membranschädigende Molekül der Killerzellen ist das sogenannte Perforin, das eine hohe Affinität für die lipophile Membran der Zielzelle besitzt. Mehrere Moleküle dringen in die Doppelschichtmembran der Zielzelle ein und bilden sodann einen Zylinder-ähnlichen wasserdurchlässigen Kanal quer durch die Lipiddoppelmembran der Zielzelle. Durch den hydrophilen Innenraum des transmembranösen Kanals können Wassermoleküle und Elektrolytsalze sich frei bewegen. Dadurch wird das osmotische Gleichgewicht der Zelle gestört und die Zielzelle geht infolge des Einstromens von Kochsalz- und Kalzium-haltigem Wasser aus dem extrazellulären Milieu zugrunde.

Das humorale System der Immunabwehr besteht aus einer Vielzahl löslicher Plasmaproteine, die miteinander interagieren und eine fein abgestufte Kaskade ähnlich der des Gerinnungssystems bilden. Der eigentliche terminale Schritt bei der Komplementaktivierung führt zu einer Membranschädigung der Zielzelle nach dem gleichen Prinzip wie bei der durch Perforin verursachten Lyse der Zielzellen. Die Zusammenlegung der terminalen Komponenten des Komplementsystems wird durch die Spaltung von Komplementprotein C5 in zwei Bruchstücke C5a und C5b eingeleitet. Das carboxy-terminale Hauptfragment C5b lagert sich mit C6, C7 und C8 zu einem makromolekularen Komplex zusammen, dessen Hydrophobizität mit der Anlagerung von C7 und C8 beträchtlich zunimmt und an die Lipiddoppelmembran binden kann. Der C5b-8 Komplex selbst bildet noch keine funktionelle Pore in der Lipidmembran. Membrangebunden übernimmt er die Rolle eines Rezeptors, der die Anlagerung mehrerer C9 Moleküle zu einem durchlässigen Membrankanal steuert.

Lösliche Perforin-Monomere und der stabile, lösliche C5b-6 Komplex können sich vom Ort ihrer Freisetzung bzw. Generierung entfernen und in die Umgebung diffundieren, so daß benachbarte gesunde Zellen getroffen werden könnten. Seit langem wurden daher wirksame Regulationsmechanismen vermutet, die eine unkontrollierte Ausbreitung potentiell lytischer Moleküle verhindern.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, natürliche Inhibitoren für die bekannten immunologischen Effektormoleküle, d. h. für das aus T-Zellen und Killerzellen stammende Perforin und für die terminalen Komplement-Proteine des menschlichen Plasmas, zu finden und gentechnisch herzustellen.

Gelöst wurde diese Aufgabe dadurch, daß die Aminosäuresequenz von Teilen des Glykoproteins ZLI durch Sequenzieren der ersten zwanzig aminoterminalen Aminosäuren nach dem Edman-Abbauverfahren aufgeklärt wurde, anhand dieser Sequenzen synthetische DNA-Sonden hergestellt wurden und hiermit eine im Beispiel genannte Leber-spezifische C-DNA-Bibliothek durchsucht wurde. Das neue Gen wurde im menschlichen Genom kloniert. Dieses Gen kodiert für ein Eiweißmolekül, das den internationalen Namen "Cytolysis inhibitor" (CLI oder ZLI) trägt. Dieses Polypeptid ist ein wesentlicher und charakteristischer Bestandteil einer neuen Blutplasmakomponente mit den oben genannten Eigenschaften.

Nach Isolierung des rekombinanten Plasmids pGEM4 des Klon ZLI-1 nach einer Routinemethode wurde dieses mit Hilfe von Restriktionsenzymen analysiert. Es wurde die Größe der DNA-Insertion mit pGEM4 Vektor bestimmt.

Die Erfindung betrifft somit eine DNA, kodierend für den spezifischen Eiweißanteil einer neuen Blutplasmakomponente und für ein Reinigungsverfahren für die natürliche Blutplasmakomponente, die durch das ZLI-Eiweißmolekül gekennzeichnet ist und die eine Hemmwirkung auf die durch Komplementproteine vermittelte Zielzell-Lyse und auf das aus Killerzellen isolierte Perforin ausübt. Die Erfindung betrifft insbesondere die in Abb. 2 dargestellte Nukleotidbasensequenz vom Klon ZLI-1 und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Erfindung betrifft außerdem das in Abb. 1 dargestellte Plasmid pGEM4/ZLI-1, Wirtsorganismen, die mit diesem Plasmid transformiert sind und den Zytolyse-Inhibitor aus humanem Plasma, der erstmals isoliert wurde.

Des weiteren umfaßt diese Erfindung den monoklonalen Antikörper ZLI-9 aus der Hybridoma-Linie ZLI-9 und seine Verwendung zur Isolierung und Reinigung von ZLI aus humanem Plasma und seine Verwendung zum quantitativen Nachweis der natürlichen Blutplasmakomponente, des von der ZLI cDNA kodierten Polypeptides und der mit ZLI assoziierten Reaktionsprodukte in biologischen Flüssigkeiten. Schließlich betrifft diese Erfindung auch die pharmazeutische Verwendung von ZLI zu therapeutischen und prophylaktischen Zwecken.

Bei der Charakterisierung des löslichen terminalen Komplementkomplexes mit Hilfe monoklonaler Antikörper stellte sich heraus, daß im terminalen Komplementkomplex neben dem bereits bekannten S-Protein/Vitronectin ein weiteres noch unbekanntes Protein, Zytolyse-Inhibitor, vorkommt. Dieses Protein wurde durch einen monoklonalen Antikörper identifiziert, der wider Erwarten nicht das S-Protein erkannte. Es stellte sich heraus, daß ZLI kein Bestandteil des membran-gebundenen, lytischen Komplementkomplexes ist.

Durch Affinitätschromatographie mit Hilfe des monoklonalen Antikörper ZLI-9 gelang es, die korrespondie-

rende Komponente aus menschlichem Plasma in funktionell aktiver Form zu isolieren und anzusequenzieren. Gereinigtes ZLI hat ein Molekulargewicht von 70 kDa unter nichtreduzierenden Bedingungen und ein Molekulargewicht von 35 kDa unter reduzierenden Bedingungen in der Natrium-Dodecylsulfat-Gelelektrophorese. Ein Vergleich mit allen bisher bekannten Proteinsequenzen, die in der Literatur veröffentlicht worden sind, ergab, daß die komplette Proteinstruktur des ZLI und die entsprechende Nukleotidbasensequenz bisher nicht ermittelt worden sind.

Aufgrund der immunologischen und molekularbiologischen Identifizierung des Glykoproteins ZLI konnte eine neue Komponente aus menschlichem Plasma mit Hilfe monoklonaler Antikörper in ausreichenden Mengen isoliert und gereinigt und auf seine inhibitorische Wirkung untersucht. Die isolierte Blutplasmakomponente wirkt einer unerwünschten Zellerstörung entgegen. Sie neutralisiert in konzentrationsabhängiger Weise das zytolytische Potential der sich bildenden C5b-7 Komplexe in der extrazellulären Flüssigkeit und im Plasma. Die Empfindlichkeit körpereigener Zellen gegenüber Komplement- und Perforin-Lyse wird verringert und die Schwelle für Zellschädigung erhöht. Das Glykoprotein ZLI kommt auch in der menschlichen Samenflüssigkeit vor.

Unter Verwendung gentechnologischer Methoden und basierend auf der erstellten partiellen Aminosäuresequenz, die mit einer bereits publizierten partiellen Sequenz übereinstimmte, konnte die komplette cDNA-Sequenz des ZLI aus einer Leber-spezifischen Genbank isoliert und analysiert werden. Der Klon ZLI-1 ist 1651 Basenpaare lang und weist einen offenen Leserahmen beginnend mit der 199. Nukleotidbase auf. Die von der Nukleotidbasensequenz abgeleitete Aminosäuresequenz hat 448 Aminosäurereste. Die ersten 21 Aminosäuren bilden ein typisches hydrophobes Signalpeptid, das bei der Translokation in das rauhe endoplasmatische Retikulum entfernt wird. Das reife sezernierte Protein beginnt daher mit der Sequenz D-Q-T-V-S-D-N-E (die Asparaginsäure, D, trägt die Nummer 1). Die zweikettige Form des ZLI rührt daher, daß noch vor der Sekretion des ZLI in das humane Plasma durch eine noch unbekannte zelluläre Protease die Peptidbindung zwischen dem Arginin-205 und dem Serin-206 hydrolysiert wird.

Durch die sog. Southern-Blot-Analyse wurde gezeigt, daß ZLI nur durch ein einziges Gen im Genom des Menschen und in der Ratte repräsentiert wird. Die Existenz sehr ähnlicher oder hochhomologer Gene, d. h. das Vorhandensein einer Genfamilie, wurde dadurch mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. Dieses Ergebnis ist besonders wichtig im Hinblick darauf, daß mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers ZLI-9 der Zytolyse-Inhibitor auch in der Samenflüssigkeit eindeutig identifiziert werden konnte.

Sowohl das Molekulargewicht als auch die Reaktivität mit dem monoklonalen Antikörper ZLI-9 lassen den eindeutigen Schluß zu, daß es sich bei dem Protein in der menschlichen Samenflüssigkeit um das gleiche Genprodukt handelt.

Die mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers ZLI-9 isolierte Blutplasmakomponente ist durch ihre speziellen biochemischen Eigenschaften in der Lage, die Membran-bindende und Membran-inserierende Aktivität der naszenten Komplement-Komplexe und des monomeren Perforins zu neutralisieren. Die biologische Aktivität der gereinigten Blutplasmakomponente könnte durch die Polypeptidkette, den damit assoziierten Kohlenhydratanteil oder durch ZLI-assoziierte Lipidanteile vermittelt werden.

Die anti-zytolytische Aktivität des ZLI wurde durch in vitro-Experimente mit Schafserthrozyten nachgewiesen. Mit steigenden ZLI-Konzentrationen wurde die Effizienz der Erythrozytenlyse erschwert. Die wirksamen ZLI-Konzentrationen bewegen sich in einem Bereich, der in der Nähe oder etwas unterhalb des natürlichen Plasmaspiegels liegt. Die Erhöhung der ZLI-Plasmaspiegel durch externe Zufuhr stellt ein therapeutisches Prinzip dar, um erhöhte systemische Komplementaktivität im Körper zu kompensieren.

Durch die Isolierung und Charakterisierung von ZLI ist man in der Lage, Plasmaspiegel des Zytolyse-Inhibitors durch pharmazeutische oder biologische Wirkstoffe, die die Genexpression des Zytolyse-Inhibitors in der Leber oder in anderen Geweben, z. B. den Sertoli-Zellen, verändern, zu steuern. Damit ist auch die Entwicklung von immunologischen Methoden zur Bestimmung der ZLI-Konzentrationen in menschlichen Körperflüssigkeiten möglich.

Die Erfindung beinhaltet außerdem die systemische oder lokale Verabreichung des ZLI zur Behandlung Gewebe-zerstörender Krankheitsvorgänge, die durch Komplement und Killerzellen bedingt sind, und die lokale oder systemische Verabreichung von ZLI zur Detoxifikation von membranaktiven Peptiden und zytolytischen Proteinen, die von Krankheitserregern, z. B. von Bakterien (u. a. Staphylokokkus aureus, Escherichia coli), Pilzen oder Insekten (z. B. im Gift von Honigbienen, Wespen, Hornissen, Hummeln enthalten) abgegeben werden.

Beispiele

Beispiel 1

Isolierung des Zytolysis-Inhibitor (ZLI)-Gens

a) Entwerfen einer Sonde und Herstellung von synthetischen Oligonukleotiden

Von der partiellen Aminosäuresequenz der beiden Ketten des ZLI werden über den genetischen Code Nukleotidsäuresequenzen abgeleitet und die entsprechenden Oligonukleotide als Hybridisierungs sonden synthetisiert. Da der genetische Code degeneriert ist, d. h. zumeist mehrere Codons für dieselbe Aminosäure kodieren können, werden zwei lange Oligonukleotide synthetisiert und gemäß den Regeln von Lathe, J. Mol. Biol. 183, 1—12, 1985, nur diejenigen Codons ausgewählt, die aufgrund statistischer Erfahrungswerte mit größter Wahrscheinlichkeit in menschlichen Genen für die jeweiligen Aminosäuren anzutreffen sind. Für die Sonde 1 wird die Partialsequenz DNELQEMSNQG, für die Sonde 2 die Partialsequenz PYEPLNFHAMEQPFLEM

ausgewählt. Diese Proteinsequenzen werden nach Beispiel 2) bzw. nach Murphy et al., J. Clin. Invest. 81, 18 589-1864, 1988, bestimmt. Die resultierenden synthetischen Hybridisierungs sonden haben die folgenden Nukleotidbasensequenzen für Sonde 1: 5'-GAC AAT GAG CTG CAG GAG ATG TCC AAC CAG GG-3'; für Sonde 2: 5'-CCC TAT GAG CCC CTG AAC TTC CAC GCC ATG TTC CAG CCC TTC CTG GAG ATG-3'. Der Vergleich mit der später ermittelten, korrektiven cDNA-Sequenz ergibt, daß beide Sonden nur durch drei Nukleotidbasen von der richtigen cDNA-Sequenz abweichen und die Sonde 1, ein 32-Oligomer, für die Aminosäure 6 bis 15 der a-Kette und die Sonde 2, ein 51-Oligomer, für die Aminosäuren 7 bis 23 auf der b-Kette kodiert.

b) Terminale Markierung der Oligomer-Sonden

Die Sonden werden am 5'-Terminus unter Verwendung von [Gamma-³²P]dATP (Amersham) und T4-Polynukleotidkinase (Pharmacia-LKB, Schweden) radioaktiv markiert. Die 20 µl Reaktionslösung enthält 70 mM Tris-Hydrochlorid, pH 7,6, 10 mM MgCl₂ und 5 mM DTT, 3 pMol des jeweiligen Oligomers, 9 pMol [Gamma-³²P]dATP und 6 Einheiten T4-DNA-Polynukleotidkinase und wird bei 37°C für 30 Min. inkubiert. Das freie nicht verwertete [Gamma-³²P]dATP wird durch Gelfiltration (NAP 25, Pharmacia-LKB, Schweden) von den Oligonukleotiden abgetrennt.

c) Screenen einer cDNA-Bibliothek der Leber

Die sogenannte Kolonie-Hybridisierung für Bakterienklone wird unter Verwendung großer Koloniedichten durchgeführt. Ungefähr 200 000 Bakterien einer Leber-spezifischen cDNA-Bibliothek (Haeffliger, J.-A., Jenne, D., Stanley, K. K. and Tschopp, J., Biochem. Biophys. Res. Commun. 149, 750-754, 1987) werden auf 20 Ampicillin-haltigen (50 µg/ml) Agarplatten der Größe 22 cm x 22 cm ausgestrichen. Als Agar-Medium wird 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l NaCl, und 1,6% (G/V) BactoAgar verwendet. Nachdem die Bakterien 20 Stunden lang über Nacht bei 37°C kultiviert worden sind, werden die etwa 1 mm großen rundlichen Kolonien durch einfaches Abklatschen von den Agarplatten auf Nitrocellulose-Filter (Schleicher und Schüll) übertragen. Auf den ursprünglichen Agarböden werden die Bakterienkolonien für 7 Stunden weiterkultiviert und so ein vermehrungsfähiges Replikat für jede Kolonie auf den Nitrocellulosefiltern angelegt. Die Bakterien-Kolonien auf den Nitrocellulosefiltern werden durch Natrium-Dodecylsulfat und Natronlauge solubilisiert. Während der Inkubation der Nitrocellulosefilter in alkalischer Lösung wird die bakterielle DNA freigesetzt, denaturiert und als einsträngige DNA an die Filtermembran gebunden. Nach einigen Waschvorgängen mit neutralen Puffern wird die DNA durch Erhitzen an die Nitrocellulose fest fixiert (Davies, L. G., Dübner, M. D. and Battey, J. F., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, New York, 1986). Um die unspezifische Bindung der Sonde an die Nitrocellulose zu unterbinden, werden die Filter vier Stunden lang bei 50°C vorhybrisiert. Die Lösung besteht aus 6 x SSC (1 x SSC enthält 0,15 M NaCl, 0,015 M Natriumcitrat), 5 x Denhardtsche Lösung (gemäß Maniatis, T. et al. in Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982), 0,1% Natriumdodecylsulfat, 10 mM EDTA und 50 µg/ml beschaltete und durch fünfminütiges Kochen denaturierte Lachsspermien-DNA (= Hybridisierungslösung). Die Hybridisierung mit der 51er Oligomer-Sonde erfolgt bei 50°C in frischer Hybridisierungslösung über vier Stunden. Die Konzentration der radioaktiven Sonde in der Hybridisierungslösung beträgt 5 x 10⁴ cpm/ml. Die Nitrocellulosefilter werden bei 45°C in 1 x SSC und 0,1% SDS (Gewicht/Volumen) 60 Min. lang gewaschen und über Nacht einem Röntgenfilm bei -70°C ausgesetzt. Am nächsten Tag wird die 51er Sonde durch 10minütiges Kochen in einer 10 mM EDTA und 1%igen wäßrigen Glycerol-Lösung entfernt. Die Filter werden einem zweiten Screening-Verfahren mit der 32er Sonde unterworfen. Nur an drei Stellen auf den 20 Filtern wird ein starkes eindeutiges Signal mit beiden Sonden beobachtet. Bakterienklone von diese Stellen werden durch Ausstreichen und erneute Kultivierung auf kleinen Agarplatten ein zweites Mal untersucht. Dabei wird die Bakteriendichte soweit herabgesetzt, daß die Kolonien einzeln stehen und nicht mit Nachbarkolonien vermischt sind. Die Analyse von jeweils 30 Kolonien aus den drei positiven Regionen ergibt schließlich 3 unabhängige Bakterienklone, die mit beiden Sonden reagieren.

d) Charakterisierung und Isolierung der cDNA des Klons ZLI-1

Das rekombinante Plasmid des Klon ZLI-1 wird nach einer Routine-Methode isoliert und durch Restriktionsenzyme analysiert (L. G. Davies et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, New York, 1986). Die DNA wird mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Kpn I gespalten. Die erhaltenen DNA-Fragmente werden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Größe der DNA-Insertion im pGEM4 Vektor bestimmt. Die Länge der cDNA beläuft sich auf 1,7 kb; es sind keine internen Bam HI und Kpn I Schnittstellen vorhanden (Abb. 1). Ungefähr 20 µg der cDNA werden durch Agarose-Gelelektrophorese vom pGEM4 Vektor-Plasmid getrennt und für die DNA-Sequenz-Bestimmung gereinigt.

e) cDNA-Basensequenzbestimmung

Die cDNA des Klons ZLI-1 wird nach Selbstligation durch Beschallung im Ultraschallwasserbad in zufallsmäßig verteilte Subfragmente zerlegt und durch Elektrophorese in 1,3%iger NA-Agarose (Pharmacia) der Größe nach fraktioniert. Diejenigen Fragmente, die in den Molekulargewichtsbereich von 300 bis 600 bp fallen, werden isoliert und die Enden mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase repariert, so daß glatte Enden entstehen. Die auf diese Weise hergestellten cDNA-Stücke werden in die Sma I Restriktionsschnittstelle des M13mp8 Vektors unter Verwendung von T4 DNA Ligase eingefügt. Die einzelsträngigen Phagen des M13 Vektors werden nach

Standardmethoden präpariert (L. G. Davies et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, New York, 1986) und die Nukleotidsequenz von etwa 50 Subfragmenten mit Hilfe des Sequenase-Kits (United States Biochemical Corporation) bestimmt. Die Nukleotidbasensequenz der ZLI-1 cDNA wird auf beiden Strängen mindestens einmal bestimmt. Die sich überlappenden Teilsequenzen werden mit Hilfe eines Mikrocomputers verglichen und zur Gesamtsequenz zusammengefügt (Abb. 2).

f) Southern-Analyse des Genoms der Ratte und des Menschen

5 µg Gesamt-DNA des Menschen und der Ratte (Genofit, Genf) werden mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bam HI, Bgl II, Eco RI und Hind III in Fragmente zerlegt und danach in 0,8% Agarose elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Überführung auf eine Nylon-Membran durch die Vakuum-Blot-Methode (Pharmacia-LKB) wird die Filtermembran mit Hilfe radioaktiv-markierter einzelsträngiger cDNA des ZLI-1 Klon analysiert. Die cDNA Sonde hybridisiert mit ein bis höchstens drei Fragmenten im Genom der Ratte und des Menschen je nachdem, welches der fünf Restriktionsenzyme verwendet wird (Abb. 3). Die Tatsache, daß man sowohl bei der Ratte (Eco RI) als auch beim Menschen (Bam HI) die komplette cDNA-Sequenz des ZLI auf einem einzigen Restriktionsfragment lokalisieren kann, beweist, daß es nur ein einziges Gen für die Biosynthese des Zytolyse-Inhibitors bei der Ratte und beim Menschen gibt.

Beispiel 2

Reinigung, biochemische Charakterisierung und Identifizierung von ZLI mit Hilfe monoklonaler Antikörper

a) Isolierung des ZLI- und S-Proteins aus Komplement-aktiviertem Serum

Der alternative Weg der Komplement-Kaskade wird in 1 l humanen Serum durch Zugabe von Inulin (10 mg/ml, Merck) aktiviert. Der entstandene lösliche terminale Komplement-Komplex, der sog. "SC5b-9-Komplex", wird nach Bhakdi und Roth (J. Immunol., 127, 576—582, 1981) isoliert. Im Falle der Abwesenheit von Zielzell-Membranen bei der Komplementaktivierung, entsteht dieser Komplex durch die Zusammenlagerung der Komplement-Proteine C5b, C6, C7, C8, C9, S-Protein und ZLI. In Anwesenheit von anionischen Detergenzien dissoziieren S-Protein und ZLI vom Komplex ab. Zu einer Lösung von 0,6 mg bis 1,2 mg/ml SC5b-9 Komplex wird 250 mM Deoxycholat (DOC) in fester Form dazugegeben. Diese Lösung wird in Anwesenheit von 2 mM PMSF bei 37°C eine Stunde inkubiert. Je 4 ml wurden auf einen linearen Sucrosegradienten (40 ml totales Volumen, 10 Gew.-% bis 40 Gew.-% Sucrose in 6,25 mM DOC, 10 mM Tris-Hydrochlorid, pH 8,1, 50 mM NaCl und 7,5 mM Na₂N₃) geladen und 3 Stunden bei 4°C und 250 000 g in einem Beckman Vertikalrotor (Typ VTi-50) zentrifugiert. 2 ml Fraktionen werden vom Boden des Zentrifugenröhrchens gesammelt. Die Fraktionen, welche S-Protein und ZLI enthalten, werden gepoolt und ca. 5fach konzentriert (Amicon PM10 Membranen). Die Proteine werden dann mit Hilfe einer Gelfiltrationssäule (Sephacryl S-300, 1 cm x 60 cm Säule, Pharmacia) aufgetrennt. Der Äquilibrationsspuffer ist 10 mM Tris-Hydrochlorid, 50 mM NaCl, pH 8,1. ZLI und S-Protein eluieren in einem Peak. Die Fraktionen werden konzentriert (Proteinkonzentration zwischen 0,4 mg/ml und 0,6 mg/ml) und bei -20°C aufbewahrt.

b) Herstellung monoklonaler Antikörper

500 µl des Gemisches aus S-Protein und ZLI werden in weibliche Balb/c Mäuse in komplettem Freundschens Adjuvanz (1 : 1; Vol/Vol.) subkutan eingespritzt. Nach 5 Wochen wird die Injektion von 500 µl des Antigens, diesmal in unvollständigem Freundschens Adjuvanz, wiederholt. Nach weiteren 5 Wochen werden 500 µl Antigen ohne Adjuvanz intraperitoneal verabreicht und die Mäuse dann nach 3—4 Tagen getötet.

Myelom-Zellen werden in RPMI 1640 Medium kultiviert, welches zusätzlich 10% inaktiviertes fötales Kälberserum, 1% Glutamin, 5000 U/ml Penicillin, 5 µg/ml Streptomycin und 0,02 mM 2-Mercaptoäthanol enthält (Myelom-Medium). Die Myelom-Zellen werden bei 37°C in 12 Petrischalen von 9 cm Durchmesser solange kultiviert, bis sie anfangen, konfluent zu werden. Die Myelom-Zellen und die Zellen der Milz einer immunisierten Maus werden in Serum-freiem Medium miteinander gemischt und bei 1200 Umdrehungen pro Minute pelletiert. Das Zell-Sediment wird in 2 ml der Fusionslösung (50% PEG 4000 in RPMI 1640) vorsichtig resuspendiert und 2 Min. lang bei 37°C langsam mit einer Pipette gemischt. Die Fusionslösung wird dann mit 20 ml RPMI 1640 verdünnt. Danach werden die Zellen sedimentiert und in 20 ml frischem Myelom-Medium auf 4 Mikrotiterplatten (96 Kammern) verteilt. Die Kulturkammern enthalten Macrophagen, welche durch Spülung der Peritonealhöhle von 2 Mäusen gewonnen werden. An jedem darauffolgenden zweiten Tag wird das Myelom-Medium, das zwecks Selektion dann zusätzlich $0,1 \times 10^{-2}$ mM Hypoxanthin, 4×10^{-4} mM Aminopterin und $1,6 \times 10^{-2}$ mM Thymidin (= HAT-Medium) enthält, gewechselt. Hybridoma-Kulturüberstände werden mit Hilfe eines ELISA-Testes auf ZLI- und S-Protein-spezifische monoklonale Antikörper hin untersucht. Positive Hybridoma-Zellen werden 3x kloniert und anschließend in Balb/c Mäuse, die mit 500 µl Pristan vorbehandelt worden sind, eingespritzt. Aszites-Flüssigkeit wird 2—3 Wochen später aus der Bauchhöhle abpunktiert (Jenne, D., Hugo, F. und Bhakdi, S., Biosci. Rep. 5, 343—352, 1985). Der monoklonale Antikörper, ZLI-9, ist nicht gegen das S-Protein gerichtet und wird zur Affinitätsreinigung von ZLI benutzt (Bhakdi, S., Jenne, D., Hugo, F., J. Immunol. Meth. 80, 25—32, 1985). Durch Immunisierung mit gereinigtem ZLI werden weitere Immunglobulin-sezernierende Hybridoma-Linien etabliert. Die Hybridoma-Linie mit der Bezeichnung ZLI-9 wurde bei der European (Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, SP4 OJG, Großbritannien unter der "provisional accession number 89 052 602", hinterlegt. Die von ZLI-9 sezernierten monoklonalen Antikörper reagieren mit reduziertem und nichtreduzier-

tem ZLI im Western Blot analog wie in Beispiel 2, e).

c) Affinitätsreinigung von ZLI

Der monoklonale Antikörper ZLI-9 wird aus 1 ml Aszites-Flüssigkeit gereinigt. Dazu wird die Aszites-Flüssigkeit über eine 2 ml Protein-A Sepharose-Säule gegeben, welche in 10 mM Tris-Hydrochlorid, pH 7,4, 150 mM NaCl (nachfolgend TBS genannt) äquilibriert ist. Die Antikörper werden mit 10 ml 0,2 M Glycin, pH 2,8, 0,5 M NaCl eluiert. 4 mg des gereinigten Antikörpers werden anschließend an 1,5 ml Bromcyan-aktivierte Sepharose gekoppelt (gemäß der Vorschrift des Herstellers Pharmacia). Für eine zweite Säule werden 20 mg humanes Immunglobulin (Sandoglobulin, Rotes Kreuz, Bern) an 4 ml Bromcyan-aktivierte Sepharose gekoppelt. 20 ml frisches humanes EDTA Plasma (10 mM EDTA), werden mit 10 ml TBS verdünnt und zuerst auf die humane IgG-Affinitätssäule aufgetragen (äquilibriert in TBS). Die nicht absorbierten Proteine werden danach über die anti-ZLI Affinitätssäule geschickt. Diese Säule wird mit 10 ml TBS-Puffer, dem 1,5 M NaCl zugemischt worden sind, gewaschen. Reines ZLI wird mit 10 ml 0,2 M Glycin-Puffer, 0,5 M NaCl, pH 2,8 eluiert. Ungefähr 0,5 mg ZLI können so in einem Puffervolumen von 5 ml gewonnen werden. Gereinigtes ZLI wird gegen TBS dialysiert (16 Stunden) und entweder bei 4°C für einige Tage gelagert oder in kleinen Portionen (100 µl) tiefgefroren (-20°C).

d) Aminosäure-Sequenz von ZLI

10 µg des gereinigten ZLI werden gegen 10 mM Ammoniumacetat, pH 8,0, dialysiert und auf eine Polybren-behandelte Glasfibrermembran aufgetropft. Die einzelnen Aminosäuren werden nach der Methode von Edman schrittweise abgebaut und mit Hilfe einer HPLC-Anlage analysiert (Applied Biosystems).

e) Nachweis von ZLI im Plasma und in der Samenflüssigkeit

Die sogenannte "Western Blot"-Analyse eignet sich besonders gut zur Identifizierung von ZLI. Dabei werden 1 µl der 1 : 10 verdünnten Samenflüssigkeit oder 10 µl einer 1 : 10 verdünnten Serumlösung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Laemmli, Nature 227, 680-685, 1970) nach Molekulargewichten aufgetrennt. Die Proteine werden anschließend elektrophoretisch auf Nitrocellulosemembranen (Schleicher & Schüll, 15 cm x 10 cm) transferiert (Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4355, 1979). Der Elektrophoresepuffer besteht aus 25 mM Tris-Hydrochlorid, 192 mM Glycin und 20 Vol-% Methanol. Die Proteine werden 3 Stunden bei 60 V und 220 mA transferiert. Die Nitrocellulosemembranen werden in Sättigungspuffer (1% Gelatine (Merck), 0,1% Rinder-Albumin (Böhringer), 20 mM Tris-Hydrochlorid, pH 8,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA und 0,02% Natriumazid) eine Stunde lang inkubiert, dreimal mit TBS gewaschen und über Nacht mit Aszites-Flüssigkeit des monoklonalen Antikörpers ZLI-9 (1 : 1000 verdünnt) in Inkubationspuffer (= Sättigungspuffer ohne Rinder-Albumin) inkubiert. Nach 3maligem Waschen in TBS (jeweils 5 Minuten) wird entweder ein Protein A-Peroxidase-Konjugat (1 : 1000 verdünnt, Sigma) oder ein Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat (1 : 1000 verdünnt, Dakopatis) dazugegeben. Die Nitrocellulosemembranen werden zwei weitere Stunden inkubiert. Die Peroxidase-Aktivität bestimmt man mit 4-Chlor-1-naphthol (Merck 0,075%) in Gegenwart von 0,01% (Vol/Vol.) H₂O₂ in einem Puffergemisch, welches aus 20 Vol-% Methanol und 80 Vol-% 10 mM wässriger Tris-HCl, pH 6,8 besteht. ZLI läßt sich deutlich als eine Bande im Molekulargewichtsbereich von 70 000 Dalton nachweisen. Der Antikörper ZLI-9 reagiert mit nichtreduziertem humanem ZLI, nicht jedoch mit reduziertem ZLI oder mit ZLI von anderen Tierspecies.

Beispiel 3

Biologische Aktivität von ZLI

a) Hemmung der Komplement-vermittelten Lyse durch ZLI

Im folgenden werden die funktionellen, hemmenden Eigenschaften der natürlichen ZLI-Plasmakomponente, so wie sie nach Beispiel 2c aus Plasma gereinigt wurde, im Komplement-Lysetest untersucht. Für den Lysetest werden Schafserthrozyten (Biomerieux, 1 x 10⁹ Zellen pro ml) verwendet. Die Komplementproteine C5b-6 (Podack, E. R. and Müller-Eberhard, H.-J., J. Immunol. 124, 332-336, 1980), C7 (Podack, E. R., Kolb, W. P., Esser, A. F. and Müller-Eberhard, H. J., J. Immunol. 123, 1071-1077, 1979), C8 (Kolb, W. P. and Müller-Eberhard, H. J., J. Exp. Med. 143, 1131-1139, 1976) und C9 (Podack, E. R., Tschopp, J. and Müller-Eberhard, H. J., J. Exp. Med. 156, 268-282) werden nach Standardmethoden gereinigt. 1 µg C5b-6, das in Abwesenheit von ZLI unter den nachfolgend genannten Bedingungen ca. 80% der Erythrozyten lysiert, werden mit 30 µl Schafserthrozyten in 10 mM Veronal Puffer, pH 7,4, 142 mM NaCl, 0,1% Gelatine und 10 mM EDTA (abgekürzt GVBE) vermischt und 20 Minuten lang bei 25°C inkubiert. Anschließend werden C7 (1 µg/ml Endkonzentration), C8 (0,2 µg/ml Endkonzentration) und C9 (1 µg/ml Endkonzentration), C8 (0,2 µg/ml Endkonzentration) und C9 (1 µg/ml Endkonzentration) sowie ZLI in verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0,25 µg/ml bis 50 µg/ml in einem Volumen von insgesamt 30 µl dazugegeben. Vor der Zugabe sind die vier Proteine 5 Minuten lang bei Raumtemperatur vorinkubiert worden. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C werden die intakten Erythrozyten abzentrifugiert (1500 rpm, 2 Minuten) und die Menge des in den Überstand freigesetzten Hämoglobins bei 412 nm Wellenlänge im Spektrophotometer bestimmt.

b) Hemmung der Perforin-vermittelten Lyse durch ZLI

Perforin wird nach der Methode von Masson, D. und Tschopp, J., J. Biol. Chem. 260, 9069–9072, 1985, gereinigt. 30 µl Schafserythrozyten (1×10^9 Zellen/ml) werden zuerst mit 30 µl ZLI (verschiedene Konzentrationen) 10 Minuten lang bei Raumtemperatur vorinkubiert. Perforin, welches in GVB-E soweit verdünnt wird, daß bei dem Test 80% der Erythrozyten lysieren, wird in 30 µl Puffervolumen dazugemischt. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wird das Ausmaß der Erythrozyten-Lyse, wie oben beim Komplement-Lysetest beschrieben, ermittelt.

c) Hemmung der Staphylokokken α -Hämolysin-vermittelten Lyse durch ZLI

Staphylococcus aureus zählt zu den häufigsten bakteriellen Krankheitserregern beim Menschen. Das von fast allen menschenpathogenen *Staphylococcus aureus*-Stämmen gebildete α -Hämolysin wird heute als ein wichtiger Pathogenitätsfaktor angesehen. *S. aureus* sezerniert das α -Hämolysin als ein wasserlösliches monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 34 000. Auf der Plasmamembran von eukaryontischen Zielzellen lagern sich jeweils 6 Toxinmonomere zu einem hydrophilen, transmembranalen Kanal mit einem Durchmesser von 1–2 nm zusammen. Dadurch kommt es zu einer Störung des ionischen Milieus im Inneren der Zelle, zu einem raschen Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum und im Extremfall zu einer kolloidosmotisch bedingten Lyse der Zielzelle. In sublytischen Konzentrationen kann die Arachidonsäurekaskade mit Freisetzung von hochaktiven Prostaglandinen und Leukotrienen in Endothelzellen aktiviert werden. Menschliche Blutplättchen sind besonders empfindlich gegenüber subzytolytischen Dosen von Staphylokokken- α -Hämolysin. Durch die Toxinwirkung auf Plättchen kommt es zur Plättchenaggregation und Reduktion der Gerinnungszeit im Plättchen-reichen Plasma (Bhakdi et al., J. Exp. Med., 168, 527–542, 1988).

Bisher geht man davon aus, daß spezifische neutralisierende Antikörper im Blutplasma und β -Lipoproteine (Plasma-LDL) die einzigen Faktoren darstellen, die Staphylokokken- α -Hämolysin-Moleküle inaktivieren können.

Zum Nachweis der biologischen Aktivitäten von ZLI gegenüber dem Staphylokokken- α -Hämolysin werden frisch gewaschene Kaninchen-Erythrozyten in dem nachfolgend beschriebenen Testsystem verwendet. Staphylokokken- α -Hämolysin (Staphylolysin-Reagenz, 5 Einheiten pro Flasche, Behringwerke, Marburg) wird in GVB-Puffer (GVB-E-Puffer ohne EDTA, siehe oben) verdünnt und bei 37°C eine halbe Stunde lang vorinkubiert. Danach werden zu 200 µl dieser Lösung 50 µl einer Kaninchen-Erythrozyten-Suspension (10^8 /ml) hinzugegeben. Nach einer halbstündigen Inkubation bei 37°C werden die Proben abzentrifugiert (2 min bei 12 000 g) und das freigesetzte Hämoglobin im Überstand bei 412 nm spektrophotometrisch gemessen. Totale Hämolysen wird nach Zugabe von Sodiumdodecylsulfat (Endkonzentration, 0,2 Gew.-%) gemessen. Eine 1 : 400 Verdünnung einer Arbeitslösung mit 0,04 Einheiten/ml ergibt eine 71%ige Hämolysen. Diese Toxin-Verdünnung (100 µ Einheiten/ml) wird mit verschiedenen ZLI-Konzentrationen eine halbe Stunde lang bei 37°C vorinkubiert, danach 50 µl der Kaninchen-Erythrozytensuspension hinzugefügt und nach weiteren 30 min bei 37°C die Hämolysen wie oben in den verschiedenen Ansätzen gemessen. Abb. 8 zeigt die Meßergebnisse dieser Versuche. Bereits unterhalb physiologischer Konzentration (Normalbereich: 50–100 µg/ml), bei ungefähr 15 µg ZLI/ml wird die Aktivität des Staphylokokken- α -Hämolysins fast vollständig unterdrückt.

Abb. 1 zeigt ein Schema des rekombinanten pGEM4/ZLI-1 Plasmids, das die vollständige kodierende Sequenz für den Zytolyse-Inhibitor enthält, und einige wichtige Restriktionsschnittstellen. Das Plasmid besitzt ein Ampicillin-Resistenz-Gen, das für das Enzym Beta-Lactamase kodiert, und den Sp6 bzw. T7 Promotor in unmittelbarer Nähe zur Klonierungsschnittstelle Bam HI im Polylinker. Die beiden Enden der cDNA-Insertion sind mit den Adaptor-Oligomeren A und B gemäß Haymerle, H., Herz, J., Bressan, G. M., Frank, R. and Stanley, K. K., Nucleic Acids Res. 154, 8615–8624, 1986, versehen. Dieses Plasmid wurde in *E. coli* K12 am 28. 3. 1989 bei der DSM unter der DSM-Nr. 5269 hinterlegt.

Abb. 2 zeigt die Nukleotidbasen-Sequenz vom Klon ZLI-1 und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz in der Zeile darunter. Die amino-terminalen Sequenzen unterstrichen. Am linken Bildrand ist die Nummerierung der Nukleotidbasen, am rechten Bildrand die der Aminosäuren angegeben.

Abb. 3 zeigt die Ergebnisse der Southern-Analyse; am linken Bildrand ist die Position der Molekulargewichtsmarker in Kilobasen angegeben.

Abb. 4 zeigt das gereinigte ZLI nach Auftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nichtreduzierenden (links) und reduzierenden Bedingungen (rechts).

Abb. 5 Western-Blot Nachweis (Streifen 1 bis 3') des ZLI in humanem Plasma (1), im gereinigten SC5b-9 Komplex (2), in Seminalflüssigkeit (3 und 3'). Streifen 4 zeigt die Proteine der Seminalflüssigkeit nach Anfärbung des SDS-Gels mit Commassie Blau.

Abb. 6 Hemmung der Komplementlyse durch ZLI: ZLI hemmt die Lyse der Erythrozyten durch lösliches C5b-6, C7, C8 und C9 in konzentrationsabhängiger Weise (untere Kurve), nicht jedoch die Lyse von C5b-7 Erythrozytenzwischenstufen durch C8 und C9 (obere Kurve).

Abb. 7 Hemmung der Perforin-vermittelten Erythrozytenlyse bei verschiedenen ZLI-Konzentrationen.

Abb. 8 Hemmung der Staphylokokken- α -Hämolysin-vermittelten Erythrozyten-Lyse durch ZLI.

Staphylokokken- α -Hämolysin wird mit unterschiedlichen ZLI-Konzentrationen bei 37°C in GVB-Puffer vorinkubiert und danach mit einer Kaninchen-Erythrozyten-Suspension in GBV-Puffer vermischt. Subphysiologische ZLI-Konzentrationen (15 µg/ml) unterdrücken die Toxin-bedingte Lyse der Erythrozyten fast vollständig.

Patentansprüche

1. DNA, kodieren für den Eiweißanteil einer Blutplasmakomponente mit Hemmwirkung auf die durch Komplementproteine vermittelte Zielzell-Lyse und auf das aus Killerzellen isolierte Perforin.

2. DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie der in der nachstehenden Formel wiedergegebenen Nukleotidbasen-Sequenz

```

CTGCGAACCCCTCTACTCTCCGAAGGAATTGCTCTTCTGGCTTCCACTACTTCCACCCCTGAATGCACAGGCAGCCCGGCCAACTCTCCACTA
GGATGCAGATGGATTCCGGTGTGAAGGGCTGGCTGCTGTTGCCCTCCGGCTCTTGAAGTCAAGTTCAGAGGCGTGAAGACTCCAGAATTGGAGGCATG
ATGAAGACTCTGCTGCTGTTTGTGGGGCTGCTGCTGACCTGGGAGAGTGGGCAGGCTCTGGGGGACCAGACGGTCTCAGACAATGAGCTCCAGGAATGT
CCAATCAGGGAAGTAAGTACGTC AAT AAGGAATTC AAAATGCTGTCAACGGGTGAACAGATAAAGACTCTCATAGAAAAACAACGAAGAGCGCAA
GACACTGCTCAGCAACCTAGAAGAAGCC AAG AAGAAGAAAGAGGATGCCCTAAATGAGACCAGGGAAATCAGACACAAAGCTGAAGGAGCTCCAGGAGTG
TGCAATGAGACCATGATGGCCCTCTGCGAAGAGTCTAAGCCCTGCCCTGAACAGACCTGCATGAAGTTCTACGCACCGCTCTGCAGAAGTGCTCTATGCC
TGGTTGGCCGCCAGCTTGAGGAGTCTCTGAACAGAGCTCGCCCTTCTACTTCTGGATGAATGGTGACCGCATCGACTCCCTGCTGGAGAAGCAGCCGCA
GCAGACGCACATGCTGGATGTCATGCAGGACCACTTACGCCCGCGCTCCAGCATCATAGACGAGCTCTTCCAGGACAGCTTCTTACCGGGAGCCCCAG
GATACCTACCCTACTCTGCCCTTACGCTGCCCCACCGGAGGCTCACTTCTTCTTCCCAAGTCCCGCATCGTCCCGAGCTTGATGCCCTTCTCTCCCT
ACGAGCCCTGAATCTCCACGCCATGTTCCAGCCCTTCTTGGATGATACACGAGGCTCAGCAGGCCATGGACATCCACTTCCACAGCCCGGCTTCCA
GCACCCGCCAACAGAATTCATACGAGAAGGCCAGGATGACCGGACTGTGTCCCGGGAGATCCGCCACAACCTCCACCGGCTGGCTCGGGATGAAGGACCAG
TGTGACAAGTGCCGGGAGATCTGTCTGTGACTGTTCCACCAACACCCCTCCAGGCTAAGCTGCGGGGGAGCTCGACGAATCCCTCCAGGTCGCTG
AGAGGTTGACCAGGAATATAACGAGCTGCTAAAGTCTTACCACTGCAAGATGCTCAACACCTCTCTCTTGGTGGAGCAGCTGAACGAGCAGTTTAAGTG
GGTGTCGGGCTGGCAAACTTACCGAAGCCGAGACCACTACTATCTGCGGGTCACCAAGGTGGCTTCCACACTTCTGACTCGGAGCTTCTTCCGGT
GTCACTGAGGTGGTGGTGAAGCTCTTTGACTCTGATCCCATCACTGTGACGGTCCCTGTAGAAAGTCTCCAGGAAGAACCTAAATTTATGGAGACCGTGG
CGGAGAAAGCGCTGCAGGAATACCGCAAAAGCACCGGAGGAGTGAGATGTGGATGTGCTTTTGCACCTACGGGGCATCTGACTCAAGCTCCCCCA
AGATGAGCTGCAGCCCCCAGAGAGGCTCTGCACGTCAACAACTAACCAGGC

```

entspricht.

3. DNA nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen offenen Leserahmen beginnend mit der 199. Nukleotidbase aufweist.

4. DNA nach einem der Ansprüche 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß sich die ersten 21 Aminosäuren der von der Nukleotidbasensequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz als hydrophobes Signalpeptid bei der Translokation ins endoplasmatische Retikulum abspalten.

5. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Allel zu einer der in den vorhergehenden Ansprüchen beschriebenen DNA darstellt.

6. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine degenerative Form einer der in den vorhergehenden Ansprüchen beschriebenen DNA darstellt.

7. DNA nach Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie in ein Vektorplasmid, das in Eukaryoten replizierbar ist, eingefügt ist.

8. Plasmid pGEM4/ZLI-1 (hinterlegt in E. coli unter der DSM-No. 5269).

9. Wirtsorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er mit einer DNA nach Ansprüchen 7 oder 8 transformiert ist.

10. E. coli, dadurch gekennzeichnet, daß es mit dem Plasmid nach Anspruch 8 transformiert ist.

11. Verfahren zur Herstellung einer DNA nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man in eine mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen geschnittene Vektor-DNA eine mit entsprechenden Enden versehene DNA einfügt, die für ein Polypeptid mit den Eigenschaften des Zytolyse-Inhibitors kodiert.

12. Zytolyse-Inhibitor mit den Eigenschaften der Hemmwirkung auf die durch Komplementproteine vermittelte Zielzell-Lyse.

13. Zytolyse-Inhibitor nach Anspruch 12, gekennzeichnet durch die Formel

M N T L L F V G L L L T W E S G G V L G D T V S D N E L O E M S 11
 -1 +1
 N G C S K Y V N K E I Q N A V N G V K O : K T L I E K T H E E R K 46
 T L L S V L E E A K K K K E D A L N E T R E S E T K L K E L P G V 79 5
 C N E T M A L W E E C K P C L K O T C N K F Y A R V C R S G S G L 113
 V G R Q L E E F L N O S S P F Y F M M N G D P : D S L L E N D R O 146 10
 Q T H M L D V M Q D H F S R A S S I I D E L F Q D R F E T R E P Q 179
 O T Y H Y L P F S L P H R R P H F F F P K S R I V R S : M P F S P Y 213 15
 E P L N F H A M F O P F L H M : H E A O O A M D L H F H S P A F Q 246
 H P P T E F I R E G D D D R T V C R E I R H N S T G C L R M K D O 279
 C D K C R E I L S V D C S T N N P S O A K L R R E L D E S L O V A E 313 20
 R L T R K Y N E L L K S Y Q W K M L N T S S L L E O L N E O F N M 346
 V S R L A N L T O G E D Q Y Y L R V T T V A S H T S D S D V P S G 379 25
 V T E V V V K L F D S D P I T V T V P V E V S R K N P K F M E T V A 413
 E K A L O E Y R K K H R E E 427 30

14. Bioaktive, von der natürlichen Sequenz des Zytolyse-Inhibitors abgeleitete Polypeptide.
15. Pharmazeutisch tolerierbare Salze der Polypeptide nach einem der Ansprüche 12—14.
16. Monoklonale Antikörper, die spezifisch an Segmente des Zytolyse-Inhibitors und an den isolierten Zytolyse-Inhibitor binden. 35
17. Monoklonale Antikörper ZLI-9, dadurch gekennzeichnet, daß er von der Hybridoma-Linie ZLI-9 (hinterlegt bei der ECACC unter der No. 89052602) sezerniert wird.
18. Verfahren zur Isolierung der natürlichen ZLI-Plasmakomponente aus menschlichem Plasma, dadurch gekennzeichnet, daß man humanes Plasma mit Hilfe monoklonaler Antikörper nach einem der Ansprüche 16 und 17 einer Affinitätschromatographie unterwirft. 40
19. Verwendung der Proteine oder der isolierten Plasmakomponente nach einem der Ansprüche 12 oder 13 zur therapeutischen oder prophylaktischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.
20. Verwendung der Proteine oder der isolierten Plasmakomponente nach einem der Ansprüche 12 oder 13 zur Herstellung pharmazeutischer Präparate. 45
21. Verwendung der Proteine oder der isolierten Plasmakomponente nach einem der Ansprüche 12 oder 13 als Mittel zur Behandlung entzündlicher und immunologisch bedingter Krankheiten und von Krankheitszuständen die durch einen Mangel des ZLI bzw. der natürlichen ZLI-Plasmakomponente gekennzeichnet sind.
22. Verwendung der Proteine nach einem der Ansprüche 12 oder 13 als Mittel zur Behandlung von Infertilität bei angeborenem oder erworbenem Mangel an ZLI. 50
23. Verwendung der im Zytolyse-Inhibitor der Sennvalflüssigkeit vorkommenden Kohlenhydrat-Strukturen zur Herstellung einer kontrazeptiven Vakzine.
24. Verwendung von ZLI zur Herstellung von Mitteln zur Behandlung Gewebe-zerstörender Krankheitsvorgänge, die durch Komplemente und Killerzellen bedingt sind.
25. Verwendung von ZLI zur Herstellung von Mitteln zur Defoxifikation von membranaktiven Peptiden und zytolytischen Proteinen, die von Krankheitserregern, Pilzen oder Insekten abgegeben werden. 55
26. Verwendung des ZLI-9 Antikörpers zur Entwicklung quantitativer immunologischer Bestimmungsmethoden für ZLI und ZLI-enthaltende Proteinkomplexe in Körperflüssigkeiten insbesondere zur Diagnostik von Krankheiten, die durch Änderungen der physiologischen ZLI-Spiegel oder durch das Auftreten von ZLI-Reaktionsprodukten gekennzeichnet sind. 60

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

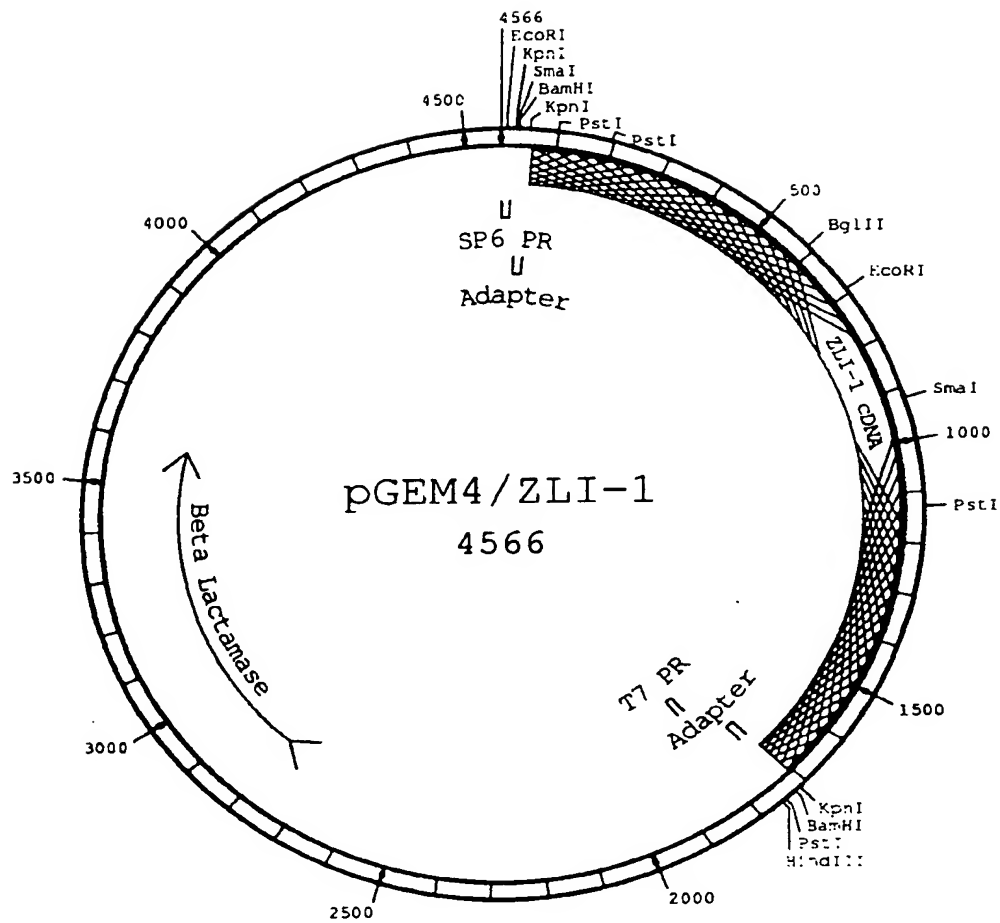


Fig. 1

1 CTGCGAACCCCTCTTACTCTCCGAAAGGAATGTCTCTTGGCTTCCACTACTTCCACCCCTGAATGACACAGGAGCCGCGCCCAAGTCTCCCACTA
99 GCGATGCCAGATGGATTGGGTGAAGGGCTGGCTGTGGCTCTTGAAGAGTCAAGTTCAGAGGCGTGCAAACTCCAGAAATTCGAGGCATG
199 ATGAGACTCTGCTGCTGTTGTGGGCTGCTGCTGACCTGGGAGAGTGGGAGAGTCTCTGGGAGCAGACGCTCTCAGACAAATGAGCTCCAGGAATGT
M K T L L L F V G L L L T W E S G Q V L G D O T V S D N E L Q E M S 13
-21
299 CCAATCAGGGAAGTAAGTACGTCAATAAGCAAAATTCATAACGGGTGAACAGAGATAAGACTCTCATAGAAAAAACAACGAGAGCCCAA
N Q G S K Y V N K E I Q N A V N G V K I K T L I E K T N E R K 46
399 CACACTGCTCACTAACCTAGACAGCCAGAGCAAGAGAGGATGCCCTAATGAGACAGGGAAATCAGACACAAAGCTCAAGGAGCTCCACGAGTG
T L S N L E E A K K K E D A L N E T R E S E T K L K E L P G V 79
499 TGCAATGAGACTATGATGGCCCTCTGGGAAGAGTGTAAAGCCCTGCTGAACAGACCTGCATGAAGTCTACGACGCGTCTGCAGAAGTGGCTCAGGCC
C N E T M M A L W E E C K P C L K Q T C M K F Y A R V C R S G S G L 113
599 TGGTTGGCCCGCAGCTTCAGGAGTTCCTGAACAGAGCTCGCCCTTCTACTTCTGGATGAATGTGACCGATCGACTCCCTGCTGGAGACGACCGCA
V G R Q L E E F L N Q S S P F Y F W M N G D R I D S L L E N D R Q 146
699 GCAGACGCACATGCTGATGTCATCGAGGACCACTTACGCCCGGCTGCAGCATATAGACGAGCTCTTCAGACAGAGTTCCTACCGCGGAGCCCCAG
Q T H M L D V M Q D H F S R A S S I I D E L F Q D R F F T R E P Q 179
799 GATACCTACCACTACCTGCCCCCTTACGCTGCCCCACCGAGGCGCTACTTCTCTTCCCAAGTCCCGCATGCTCGCGAGCTTGATCGCCCTCTCTCCGT
D T Y H Y L P F S L P H R R P H F F P K S R I V R S L M P F S P Y 213
899 ACAGACCCCTGAACCTTCCAGCGCATGTTCAGCCCTTCTTGGATGATACAGAGGCTCAGCAGGCAATGAGACTCCACTTCCAGAGCCCGCCCTTCCA
E P L N F H A M F Q P F L E M I H E A Q A M D I H F H S P A F Q 246
999 GCACCCGCCAACAGAAATTCATACGAGAGGAGGATACCGGACTGTGTGCCGGAGATCCGCCCAACTCCACGGGCTGCTCGGATGAAGGACCAAG
H P T E F I R E G D D R I T V C R E I R H N S T G C L R H M K D Q 279
1099 TGTACAGTGC CGGAGATCTTGTCTGTGGACTGTTCACCAACAAACCCCTCCAGGCTAAGCTGCGGGGAGCTCGAGCAATCCCTCCAGTCCGCTC
C D K C R E I L S V D C S T N N P S Q A K L R R E L D E S L Q V A E 313
1199 AGAGGTTGACAGAAATATAACAGCTGCTAAAGTCTTACCAGTGGAGATGTCTCAACACTCTCTTCTGCTGGAGCAGCTGAAGCAGCAGTTCCTTAACTG
R L T R K Y N E L L K S Y Q W K M L N T S S L L E Q L N E Q F N W 346
1299 GGTCTCCCGCTTGCAGAACCTCAGCAAGGAGGAGGAGTACTATCTCGGGTCCACCACGGTGGCTTCCACACTTCTGACCTGGAGCTTCCTCCGGT
V S R L A N L T Q G E D Q Y Y L R V T T V A S H T S D S D V P S G 379
1399 GTCACTCAGTTCGTTGAGCTCTTTGACTCTGTATCCCATCACTGTGAGGCTCCCTGTAGAGCTCCAGGAGAACCCCTAATTTATGGAGACCTGG
V T E V V V K L F D S D P I T V T V P V E V S R K N P K F M E T V A 413
1499 CGGAGAAGCGCTGCAGGAATACCGCAAAAACCCGGAGGAGTGAGATGTGGTGTCTTTTGCACCTACGGGGCATCTGAGTCCAGCTCCCCCCA
E K A L Q E Y R K K H R E E 427
1599 AGATGAGCTGCGCCCCCAGAGAGAGCTCTCCACGCTACCAAGTAAACGAGC 1651

Fig. 2

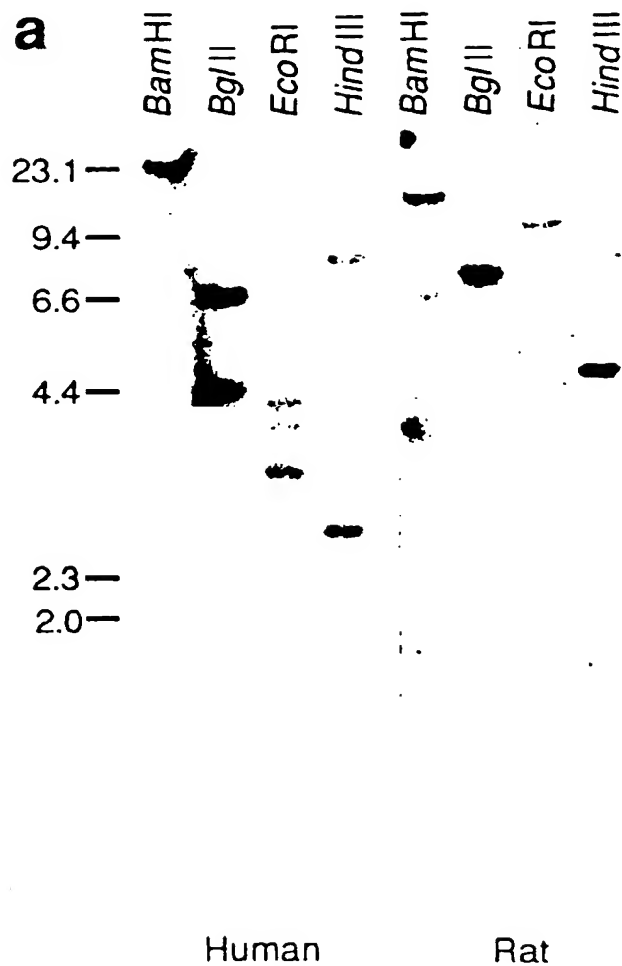


Fig. 3

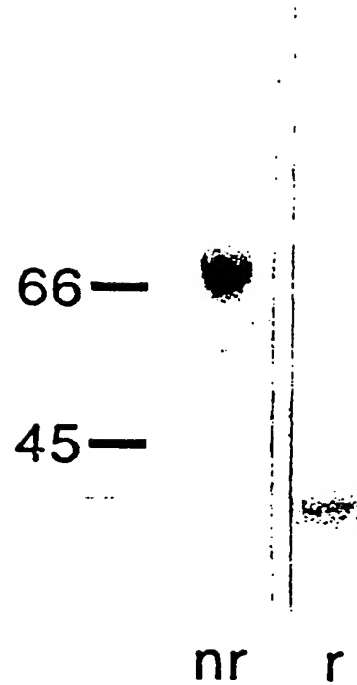


Fig. 4

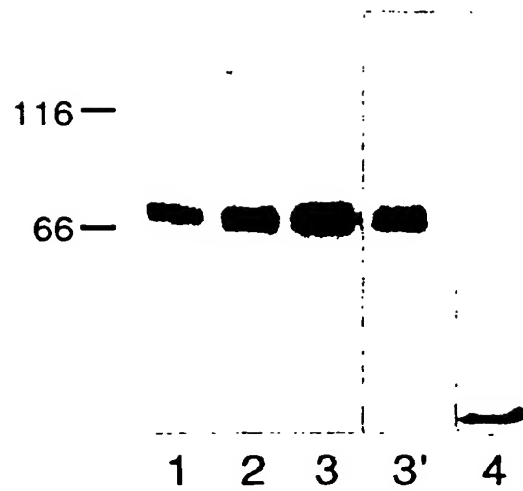


Fig. 5

Inhibition der Komplement-Zytolyse

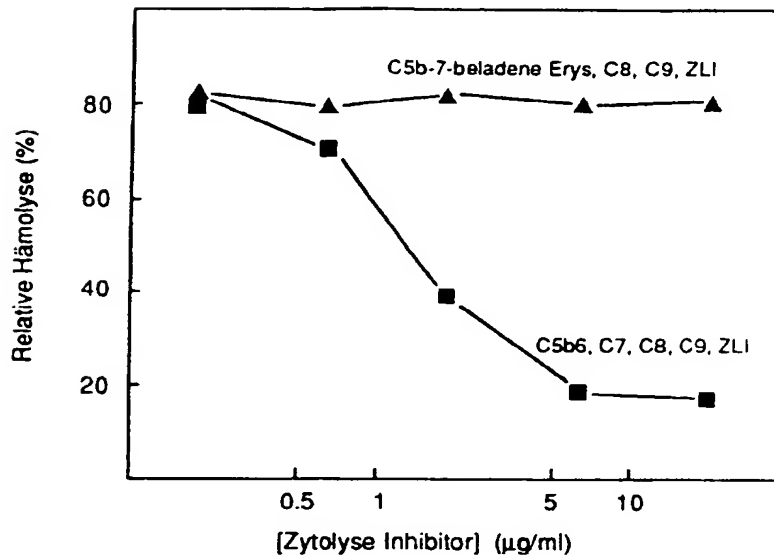


Fig. 6

Inhibition der CTL/NK-Perforin Zytolyse

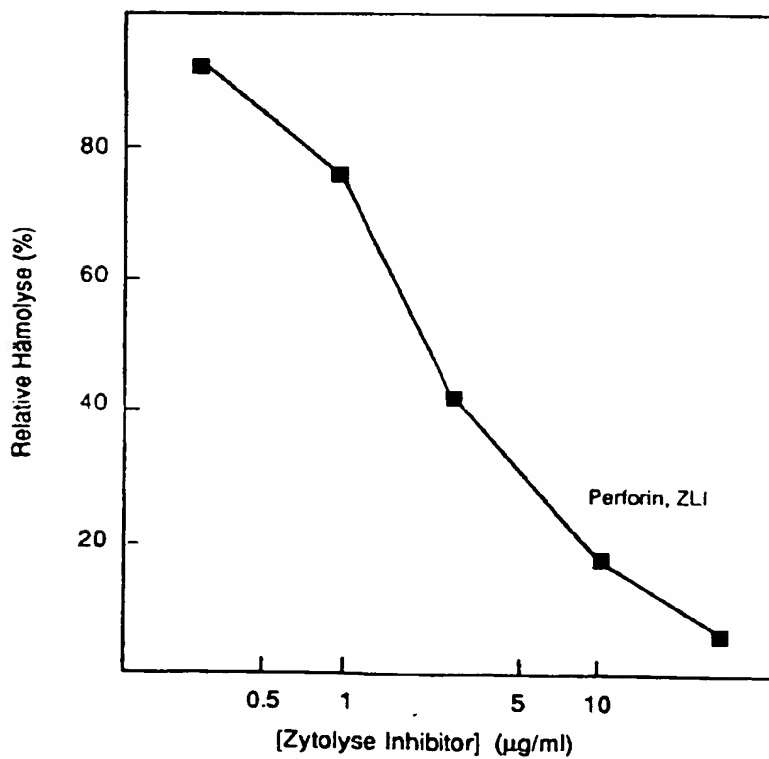


Fig. 7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.